

개 정액의 동결 및 융해후 정자의 생존성 및 수정능획득 판정을 위한 HOS test 및 CTC test

김용준¹ · 지등범 · 오홍근
전북대학교 수의과대학

Studies on HOS test and CTC test for Viability and Capacitation of Frozen-thawed Canine Sperm

Yong-jun Kim¹, Dong-beom Ji and Hong-geun Oh
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

Abstract : Evaluation of viability and capacitation of canine sperm is of great importance to determine good condition for freezing canine semen and consequently to improve conception rate by artificial insemination. Semen were collected from nine male dogs which had been proved to be fertile in the past and the semen were treated for freezing procedure. Semen were thawed at 37°C for 30 seconds. In this study, hypoosmotic swelling(HOS) test and chlortetracycline(CTC) test were performed to evaluate post-thaw viability and capacitated status of sperm, respectively. In HOS test for canine sperm, the highest percentage of curled sperm was shown at 60 mOsm. In HOS test for raw canine semen, there were considerably significant correlation between HOS values and sperm motility($r=0.9064$, $p<0.01$) and converse correlation between HOS values and sperm abnormality($r=-0.6905$, $p<0.05$). The sperm viability and HOS-values for chilled extended semen were significantly decreased from 0 to 72 hours during storage at 5°C ($p<0.05$). Of the media added to canine semen after thawing, the most capacitated sperm were shown in CCM($p<0.01$), and then Tris Fructose Citrate(TFC) medium with calcium from 3 hours after incubation with media. It was concluded that HOS test is of great value to determine the viability and motility of canine sperm, whereas CTC test is usable to determine the capacitated status. Consequently, both tests were thought to be useful as the additional tests to standard semen analysis.

Key words : evaluation, viability, capacitation, hypoosmotic swelling(HOS) test, chlortetracycline(CTC) test

서 론

개에서 동결정액의 이용시 가장 문제가 되는 것은 수태율이다. 수태율을 높이기 위해서는 수정적기의 판정, 적절한 수정기술, 등 중요한 요소들이 있으며 이와함께 수정능력이 높은 정액의 이용이 중요하다.

개 정자의 수정능력 판정을 위하여 가장 중요한 판정요인은 정자의 생존성 판정과 수정능획득 판정이라고 하겠다. 이를 위해 Linde-Forsberg 등⁷ 및 여러 연구자들^{1,2,4,5,10}은 동결-융해된 개정액에 대해 HOS

(Hypoosmotic swelling) 검사, 그리고 최근에는 다른 여러 연구자들^{3,10,12}에 의해 CTC(Chlortetracycline) 검사가 제시되고 있다. 일반적인 정액 성상 검사 중, 특히 정자 활력(정자 생존율) 검사가 주관적인 기준에 의해 이루어지고 있어 보다 정확하고 객관적인 검사가 요구되고 있으며, 이중 HOS 검사는 살아있는 정자가 저 삼투압 상태에서 수분이 정자 원형질막을 투과하여 종창되고 그 결과 tail 주부가 curled 되는 상태를 확인하여 정자의 생존율을 판단하는 검사로 알려져 있다. 또한 CTC 검사는 정자의 수정능획득시 첨체 반응의 정도를 형광염료인 Hoechst33258을 이용하여 검사하는 방법으로 알려져 있다.

따라서 이 연구에서는 개 정액을 이용하여 HOS 검사가 개 정자의 생존성 판정에 유용한지 여부, 그리고

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

¹Corresponding author.

CTC 검사가 수정능획득 판정에 가능한지의 여부를 알아보기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

실험동물 : 동결정액 제조를 위한 종모건은 과거 번식력이 입증된 바 있고, 임상검사상 건강하다고 인정되는 숫개 9두를 이용하였다. 숫개의 연령은 1.5-3세 이었고 체중은 3-45 kg이었다. 품종은 Tosa견 1두, Shizu견 1두, Maltese 1두, Poodle 2두, Yorkshire terrier 1두, Pointer 1두, 잡종견 2두 이었다.

정액의 채취 : 정액은 개체당 주 1회 오전 8-9시 사이에 채취하였고, 정자 농도가 높은 2분획을 중심으로 채취하여 그 원정액의 일부를 취하여 정자의 활력, 정자수, 기형율을 검사하였다.

동결정액 회석액의 제조 : 정액동결을 위한 회석액은 Sweden 배지¹⁰의 구성에 따라 제조하였으며, glycerol은 5%가 되도록 첨가하였다.

정액의 회석 및 냉각 : 정액검사를 한 후 산정된 정자수에 따라 ml당 1×10^6 이 되도록 원정액과 회석액의 비율을 1:2 이상이 되도록 하여 전체 회석액의 양을 조정하였다. 1차 회석은 원정액이 들어있는 시험관에 37°C로 가온된 회석액을 소량씩 분주하여 실시하였고, 이 시험관을 37°C의 물이 들어 있는 500 ml 비이커에 넣어 5°C 냉장고에서 2시간 동안 서서히 냉각하였다. 2차 회석은 1차 회석액이 5°C로 유지된 후 이미 5°C에서 유지시킨 glycerol 첨가 2차 회석액을 1시간 동안 6-10회 분할 분주하여 회석하였다.

Glycerol 평형조건 : 2차 회석을 마친 정액의 glycerol 평형은 5°C 냉장고내에서 2시간 동안 실시하였다.

정액 스트로 충전 : 정액은 0.5 ml straw내 충전하였으며 정자수는 50×10^6 /straw가 되도록 조정하였다.

동결방법 : 동결방법은 polystyrene 상자내 액체질소가스에 의해 동결하였다. 즉, polystyrene 상자내 액체질소를 채운 후 액체질소 수면위 2 cm가 되도록 철제 rack를 상자내 설치하였다. Glycerol 평형을 마친 정액 스트로는 rack 위에 올려 놓아 뚜껑을 덮고 15분 동안 동결하였다.

동결정액의 보존 : 동결된 정액 스트로는 액체 질소내 넣어 보존하였다. 보존 기간은 1개월 내지 1년 이었다.

동결정액의 용해 : 동결정액은 37°C로 조정된 수조내 넣어 30초간 용해하였다.

실험처리

HOS 검사의 최적 삼투압 조사 : 개 정자에 대한 HOS 검사의 최적 삼투압을 알아보기 위하여 숫개 7두의 원정액에 대하여 삼투압을 60 mOsm, 150 mOsm, 그리고 300 mOsm로 조성한 fructose 용액에 원정액을 넣고나서 curled/swelling된 정자의 백분율(손상되지 않은 정자막의 백분율)을 구하여 비교하였다.

원정액에 대한 일반적인 정액성상 검사와 HOS 검사치와의 상관관계 조사 : 원정액에 대한 일반적인 정액성상 검사와 HOS 검사와의 상관관계를 알아보기 위하여 60 mOsm로 조성된 HOS 배지(fructose 용액)에 원정액을 넣어 원정액 상태에서의 정자의 활력, 기형율과 생사검사에 의한 생존율과의 상관관계를 비교하였다.

HOS test는 Kumi-Diaka의 방법⁶에 따라 사용하였다. 즉, HOS test를 위하여 60 mOsm fructose solution을 사용하였다. 멸균된 test tube에 fructose 용액 1 ml를 넣고 여기에 검사하고자하는 정액(신선, 회석, 또는 동결 후 용해 정액) 0.1 ml를 첨가하여 37°C에서 45분간 배양하였다. 배양 후 slide에 배양된 액을 한 방울 떨어뜨리고나서 cover glass로 덮은 후 위상차 현미경으로 400배율에서 경검하였다. 총 200개의 정자 중 curled-swollen 정자와 그렇지 않은 정자를 세어 curled-swollen 정자의 백분율을 구하였다.

5°C 보존 정액에 대한 정자의 생존 및 HOS 검사 : 정액을 회석 후 5°C로 보존된 정액에 대하여 정자의 생존 및 HOS 수치를 0, 24, 48, 72시간별로 비교하였다. 이때 회석배지는 glycerol이 첨가되지 않은 Sweden 회석배지를 이용하였다.

정액의 용해후 첨가배지에 따른 정액의 성상조사 및 CTC 검사를 이용한 수정능획득 조사 : 동결정액의 용해 후 정자의 운동성 및 수정능을 높일 수 있는 배지를 알아보려고 몇가지 다른 조건의 배지를 첨가하였고 이를 판정할 수 있는 것으로 보고된 chlortetracycline chloride(CTC) test¹¹을 사용하였다. CTC 검사를 위하여, CTC 용액은 chlortetracycline chloride 2 mg과 cysteine 4.4 mg을 5 ml CTC buffer에 넣어 제조하였다(CTC buffer: Tris 240 mg, NaCl 760 mg을 D.W 100 ml에 넣음).

1) 용해 후 배지 첨가군은 4개군으로 구별하였다.

1군 : CCM(Canine Capacitation medium)군

-이 배지는 종류수 11에 NaCl 4.880 g, KCl 0.356 g, CaCl₂ 2H₂O 0.25 g, KH₂PO₄ 0.162 g, NaHCO₃ 3.159 g, Na pyruvate 0.028 g, Na lactate 60% syrup 3.38 ml,

Glucose 0.5 g, phenol red 0.020 g을 넣어 조성하였다. 이 배지는 0.2 µm filter로 여과하였다.

2군 : TFC(Tris, Fructose, Citric acid) + CaCl₂ 군
 - Tris 3.025 g, Fructose 1.25 g, Citric acid 1.7 g, CaCl₂ 2H₂O 0.25 g/l을 100 ml D.W에 넣어 준비한 후 0.2 µm filter로 여과하여 사용하였다.

3군 : TFC(Tris, Fructose, Citric acid) - CaCl₂ 군
 - 상기 2군의 조성에서 CaCl₂만 첨가하지 않았다.

4군 : Saline 군
 - 용해후 Saline만을 첨가하였다.

상기 배지들은 정액 용해전 준비하여 1시간 정도 37°C, 5% CO₂ incubator내 넣어 보존하였다.

2) CTC 검사방법

배지간 비교를 위한 검사를 위해 정액 스트로를 4-12개 용해하여 2-6 ml로 정액 pool을 만든 후 4개의 원심분리관에 동량으로 분주하여 20°C 700 g에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리후 상층액을 제거하고나서 상기 1)항의 4개군의 배지를 각각 1 ml씩 분주하였다. 그 후 각 실험군으로부터 정액시료 200 µl를 취하여 형광염료인 Hoechst 33258(0.7 µg/ml)과 혼합하고나서 원심분리(900 g에서 5분)하여 과잉염료를 제거하였다. sperm pellet에 각 실험군 배지 45 µl를 넣어 재부유 하였고, 여기에 새롭게 만든 CTC 용액 45 µl를 첨가하였다. 20초후 각 sample을 12.5% glutaraldehyde solution 8 µl로 고정하였다. 그 후 염색된 sample 10 µl를 각각 glass slide에 놓고 여기에 glycerol이 첨가된 1,4 Diazabicyclo(4.4.4) octane triethylene diamine(DABCO) 0.22 M을 한 방울 떨어뜨렸다. 이어서 잘 혼합한 후 실험군 당 두개의 smear를 준비하여 그 위에 coverglass로 덮었다. Coverglass는 4각 주변을 손톱 광택제로 봉입하여 형광현미경하에서 당일 관찰하였다. 평가 방법은 Rota¹¹의 평가기준에 따라 CTC fluorescence가 sperm head 전체표면에 존재할 경우는 Group F (non capacitated, acrosome intact)로, 형광이 acrosome cap에는 있으나 post acrosomal region에는 있지 않을때 Group B(capacitated, acrosome intact)로, 형광이 정자의 equatorial region에만 존재할

때는 Group AR(acrosome reacted)로 분류하여 평가하였다.

400배로 경검하여 200개의 정자를 세어서 F, B, AR group의 백분율을 각각 구하였다. 경검시기는 배양 후 0, 3, 6시간에 세번으로 나뉘어 sample을 제작하여 판정하였다.

통계분석 : 이 실험에서의 결과는 실험군에 따라 T 검정 또는 ANOVA로 통계처리하였으며 ANOVA 통계처리상의 유의성 검정은 DUNCAN 다중검정에 의해 실험군간 유의차를 구하였다.

결 과

개 정자에 대한 HOS test를 위한 최적 삼투압을 알아보기 위하여 모견 7두의 원정액에 대하여 60, 150, 300 mOsm로 삼투압을 조성한 배지에 원정액을 넣어 curled/sweeling 정자의 백분율을 구한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서와 같이 개 정자는 60 mOsm과 150 mOsm에서 300 mOsm에서의 정자보다 각각 더 높은 curled 정자율, 즉, HOS 수치를 나타내었다(p<0.05). 60 mOsm과 150 mOsm간에는 유의성있는 차이는 없었으나 60 mOsm에서 더 높은 HOS 수치를 나타내었다.

60mOsm에서 원정액에 대한 일반적인 정액성상검사 성적과 HOS 수치와의 상관관계를 알아본 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서와 같이 개 원정액 정자의 생존율은 HOS 수치와 0.9054의 상관계수를 나타내 현저히 높

Table 1. Percentage of curled sperm by hypo-osmotic swelling test according to different osmolarity for raw canine semen immediately after collection (Mean±SD, n=10)

No. of animals	HOS- values		
	Osmolarity(mOsm)		
	60	150	300
7	84.10±10.46 ^a	82.20±11.55 ^a	65.20±8.15 ^b

^{a,b} : Different superscripts denote significant differences within rows(p<0.05)

Table 2. Correlation of hypo-osmotic swelling test and semen parameters for raw canine semen (% , mean±SD, n=10)

Motility	Semen analysis		HOS values at 60 mOsm	Correlation(r)	
	Abnormality	Viability*		HOS-v/Mot	HOS-v/Abn
8600±7.38	20.70±11.12	68.90±17.16	84.10±10.46	0.9054**	-0.6905***

Motility stands for mean viability HOS-V : HOS values MOT : Motility Abn : Abnormality

* : Viability by supravital staining, ** : p<0.01, *** : p<0.05

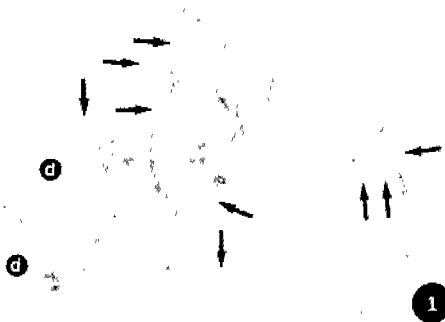


Fig 1. HOS test for canine sperm. Curled/swollen sperms are considered as live sperms(arrows).
d : dead sperm

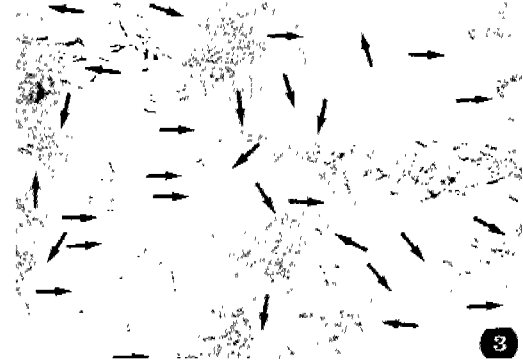


Fig 3. HOS test for canine raw sperm. A great many curled/live sperms are seen in the field(arrows).

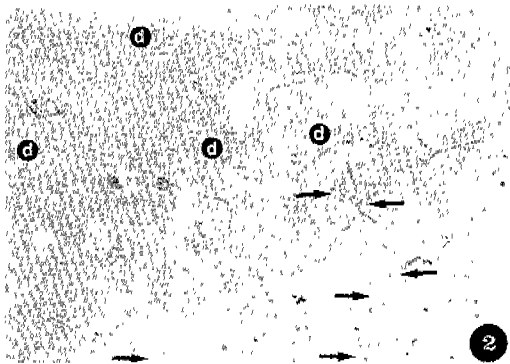


Fig 2. HOS test for canine frozen-thawed sperm. Some curled/live sperm(arrows) and dead sperms (d) are seen.

은 상관관계($p < 0.01$)를 나타내었고, 기형율과 HOS 수치는 -0.6905 의 상관계수를 나타냄으로써 유의성있는 역 상관관계($p < 0.05$)를 나타내었다.

HOS test를 동결정액 및 원정액에 대하여 실시하여 살아있는 정자와 죽은 정자를 판정한 것은 Fig. 1, 2, 3과 같다.

원정액을 회석배지로 희석후 냉장상태(5°C)에서 보존하고나서 0, 24, 48, 72시간 별로 정자의 생존율과 HOS 수치를 비교한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서와 같이 정자의 생존율은 0시간에서 72시간까지 진행될수록 감소되었으며($p < 0.05$), 이와 동시에 HOS 수치도 시간이 경과하면서 감소되었다($p < 0.05$).

정액의 용해후 정자의 수정능 획득 및 운동성을 증가시킬 수 있는 배지를 첨가하여 0, 3, 6시간동안 보존후 CTC 검사에 의한 수정능획득 검사를 하여 F, B, AR group을 형태별로 관찰한 것은 Fig 4, 5, 6과 같다. 그리고 CTC검사에 의한 수정능획득 정도를 조사한 결과는 Fig 7, 8, 9와 같다.

Fig. 7에서와 같이 F cell group의 경우 0시간에서 6시간까지 용해후 서로 다른 배지를 정액에 첨가하여 배양했을 때 CTC test에서 각 군은 배양후 3시간부터 시간이 경과할 수록 F group 세포가 감소하는 경향을 나타내었다. 한편, CCM 배지 그룹에서 가장 크게 감소하였고 이어서 TFC(+), TFC(-), saline 배지군 순으로 감소폭이 작아졌다($p < 0.01$).

Fig 8에서 B cell group의 경우, 배양 3시간부터

Table 3. Changes of sperm viability and HOS values according to different storage hours of chilled extended semen (% , mean \pm SD, n=7)

Sperm Characteristics	HOS-v	Storage hours			
		0	24 hrs	48 hrs	72 hrs
Sperm Viability		77.86 \pm 11.13 ^a	64.29 \pm 9.32 ^b	50.00 \pm 11.90 ^c	39.71 \pm 14.34 ^c
		84.86 \pm 6.74 ^a	72.86 \pm 6.26 ^b	59.29 \pm 6.47 ^c	46.86 \pm 8.88 ^d

a.b.c.d. : Different superscripts denote significant differences within rows($p < 0.05$)

Viability : Mean percentage of live sperm

HOS-v : HOS-values

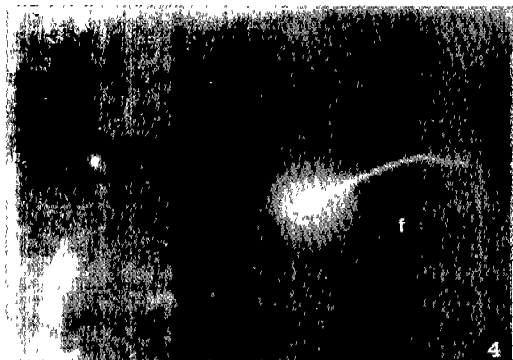


Fig 4. CTC test for canine sperm. A F group sperm with bright fluorescence on the head.

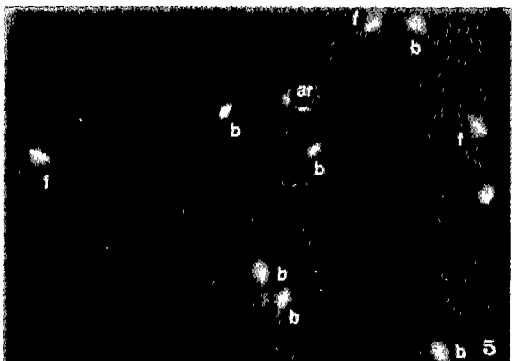


Fig 5. CTC test for canine sperm. F group(f), B group(b, capacitated, acrosome intact) and AR group(ar, acrosome reacted) sperms are seen.



Fig 6. CTC test for canine sperm. Some AR group sperms(fluorescence is remained only in the equatorial region) are seen.

CCM 배지군에서 다른 모든 배지군보다 더 많은 B cell의 증가를 보였다($p < 0.01$). TFC(+) 배지군과 TFC

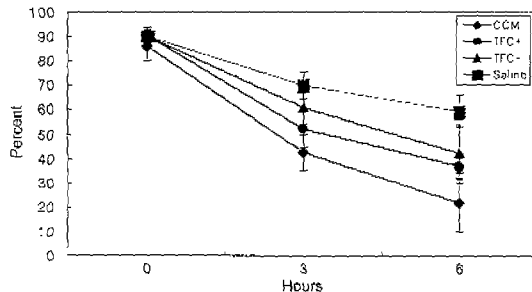


Fig 7. Hours-change of F cell group according to different media added to semen after thawing. Each value is the mean \pm SD of 5 replicated experiments. Considerable significance between groups from 3 hours ($p < 0.01$)

CCM : Canine Capacitation Medium, TFC(+) : Tris, Fructose, Citric acid + $CaCl_2$, TFC(-) : Without $CaCl_2$

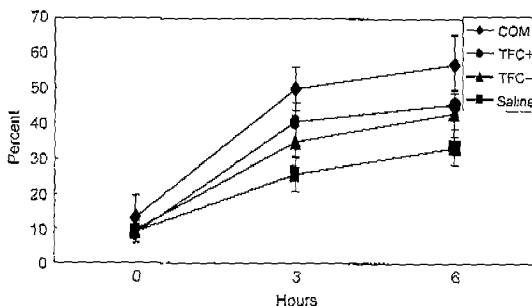


Fig 8. Hours-change of B cell group according to different media added to semen after thawing. Each value is the mean \pm SD of 5 replicated experiments. Considerable significance from 3 hours between the groups CCM vs. TFCs, and TFCs vs. saline ($p < 0.01$)

CCM : Canine Capacitation Medium, TFC(+) : Tris, Fructose, Citric acid + $CaCl_2$, TFC(-) : Without $CaCl_2$

(-)군에서는 saline 군보다 더 많은 B cell이 나타났고 ($p < 0.01$), 상호간에 유의성있는 차이는 없었으나 TFC (+)군은 TFC(-) 군보다 더 많은 B cell의 수치를 나타내었다.

Fig. 9에서 AR cell group에서는 0시간에서는 4개 군 모두 비슷한 수준이었으나 6시간 경과후 CCM 배지군에서 다른 모든 배지군에서 보다 더 많은 AR cell이 나타났고 ($p < 0.01$), TFC(+)군과 TFC(-)군은 saline 군보다 더 많은 AR cell을 나타내었다 ($p < 0.01$).

TFC(+)군과 TFC(-)군은 상호간에는 유의성있는 차이는 인정되지 않았으나 TFC(+)군에서 더 많은 AR cell의 수치를 나타내었다.

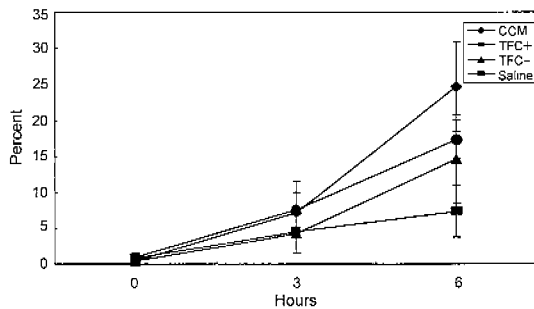


Fig 9. Hours-change of AR cell group according to different media added to semen after thawing. Each value is the mean \pm SD of 5 replicated experiments. Considerable significance from 6hours between the groups CCM vs. TFCs, and TFCs vs. saline ($p < 0.01$)

CCM : Canine Capacitation Medium, TFC(+) : Tris, Fructose, Citric acid + CaCl₂
TFC(-) : Without CaCl₂

고찰

이 실험에서 개 정자에 대한 HOS 검사시 최적의 삼투압을 알기 위하여 60, 150, 300 mOsm로 조성된 fructose solution에 개 정자를 넣었을 때 개 정자는 60과 150 mOsm에서 더 높은 HOS 수치를 나타내었다. 이 결과는 Kumi-Diaka⁶와 Rota¹¹등의 결과와 매우 유사한 결과이었으며, 60과 150 mOsm 간의 서로 유의성 있는 차이는 인정되지 않았으나 60 mOsm에서 더 높은 HOS 수치를 보였으므로, 개 정자에 대한 HOS 검사에서는 60 mOsm이 적합한 것으로 사료된다.

이 실험에서 60 mOsm에서 원정액에 대한 일반적인 정액 성상 검사와 HOS 수치와의 상관관계를 알아본 결과, 개 정자의 활력은 HOS 수치와 현저히 높은 상관관계를 보였는데 이것은 Kumi-Diaka⁶의 결과와 유사한 것이며, 정자의 활력(생존율)과 상관관계가 높은 이유는 HOS 검사가 정자막의 온전성(integrity)을 확인하는 원리에 따라 수행되기 때문인 것으로 파악된다. 즉, 살아있는 정자는 낮은 삼투압에서 수분을 원형질막을 통해 받아들여므로 증창되고 증창 상태에서 curled 상태가 발생하는 것으로 생각된다. 또한, 이 실험에서 원정액의 경우 활력은 생존율과 동일시 했다는 점에서 HOS 검사와의 상관관계를 인정할 수 있는 것으로 보인다.

기형율과는 역상관관계를 보였는데, 이것은 정자의 생존율과의 높은 상관관계를 볼때 당연히 나타날 수 있는 현상으로 풀이된다.

이 실험에서 원정액을 희석배지로 희석하여 5°C에서 보존하면서 0, 24, 48, 72시간 별로 정자의 생존율과 HOS 수치를 비교한 결과 정자의 생존율과 HOS 수치는 동일하게 시간이 경과될 수록 감소하였는데 이 결과는 Kumi-Diaka⁶ 및 Linde-Forsberg⁸의 결과와 동일한 결과로 생각된다.

이러한 점에서 지금까지 일반정액성상 검사에서 정액생존을 검사시 사용되어온 방법은 그 대부분이 주관적 수치에 의존하였는데 HOS 검사는 정액생존율의 객관적 수치를 제공함으로써 보다 더 정확한 판단을 할 수 있는 기준을 마련한 것으로 생각된다.

이 실험에서 정액의 용해후 정자의 수정능 획득 및 운동성을 증가시킬 수 있는 배지를 첨가하여 0, 3, 6 시간 동안 보존후 CTC 검사에 의한 수정능 획득 검사를 한 결과 CCM 배지군에서 수정능 획득 지수가 되는 B group 세포 및 AR group 세포가 시간이 경과할 수록 다른 그룹에 비해 크게 증가하였다. 이 결과에서 볼때 CCM 배지는 동결후 용해한 정액에 대하여 첨가하여 사용하는 것이 수태율을 향상시키기 위하여 권장할 만한 방법으로 보인다.

CCM 배지에서 개 정자의 B 그룹 및 AR 그룹의 증가는 Rota¹¹와 Guerin³도 동일하게 보고하고 있어, 정자의 수정능 획득 및 나아가 수태를 증가를 위해 첨가하는 것이 권장된다고 판단된다. 그러나, CCM 배지는 상당히 많은 성분으로 조성되고 제조상의 복잡한 점이 있어 간이방법이나 실용적인 방법에서는 다소의 문제점이 있다고 보여진다. 한편, CaCl₂가 첨가된 TFC(+)군은 CCM군 보다는 낮으나 다른군에 비해 역시 상당히 높은 수정능 획득 세포군들(B그룹, AR그룹)의 증가를 나타내고 있어 간이한 방법으로 선택될 수 있으리라 본다. CaCl₂가 첨가된 TFC(+)군에서 수정능 획득 세포군이 증가하는 것은 Ca⁺⁺의 영향으로 사료되며 이것은 Guerin³ 및 다른 연구자⁹가 Ionophore 첨가시 B와 AR 세포군이 현저히 증가했다고 보고한 결과와 유사한 결과로 판단된다.

이상의 결과 동결정액의 용해후 정자의 성상을 파악하기 위하여 HOS test는 정자의 생존을 검사로서 적합하다는 것, 그리고 CTC 검사는 정자의 수정능 획득 상태를 판정할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

결론

개 동결 정액을 이용한 인공수정시 수태율을 높일 수 있는 정자의 수정능력을 판정하기 위하여 생존성

과 수정능획득 판정을 위하여 HOS 검사와 CTC 검사를 실시하였다. 과거 번식력이 있는 모견 9두로부터 정액을 채취하여 Sweden 배지를 이용하여 희석처리하였으며, 액체질소가 들어있는 polystyren box을 이용하여 개 정액을 동결하였다. 동결정액을 37°C에서 30초간 용해한후 HOS 검사와 CTC 검사를 실시하여 각각 생존성 판정 및 수정능획득 판정 여부를 알아보았다.

1. 개 정자에 대한 HOS 검사에서 curled/swelling sperm의 율은 60 mOsm에서 가장 높게 나타났다.

2. 개 원정액에 대한 HOS 검사에서 HOS 수치와 정자 활력간에는 현저한 상관관계가 있었고($r=0.9054$, $p<0.01$), HOS 수치와 정자 기형율간에는 역상관관계가 있었다($r=-0.6905$, $p<0.05$).

3. 개 희석정액에 대한 정자생존을 및 HOS 수치는 72시간 동안 5°C에서 보존하는 기간동안 유의성있게 감소되었다($p<0.05$).

4. 용해 후 정액에 대한 배지 첨가시 CCM 배지는 보존 3시간 이후부터 가장 많은 수정능획득 정자율을 나타내었다($p<0.01$).

이상의 결과 HOS 검사는 정자의 생존을 및 운동성을 판정하기에, 그리고 CTC 검사는 정자의 수정능획득을 판정하는데 유용하여 일반 표준검사에 보조판정 검사로서 가치가 있음을 알게 되었다.

참고문헌

- England GCW, Allen WE. Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet Rec.* 1989;125:339.
- England GCW, Plunmer JM. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J Reprod Fert.* 1993;47(suppl): 261-270.
- Guerin P, Ferrer M, Fontbonne A, Benigni L, Jacquet M, Menezo Y. In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology.* 1999;52:617-628.
- Kinney GM, Pennycook JW, Schriver MD, Templeton JW, Kraemer DC. Surgical collection and transfer of canine embryos. *Biol Reprod Suppl* 1979;1:20.96A.
- Kumi-Diaka J, Badtram G. Effects of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa : in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology.* 1994;41:1355-1366.
- Kumi-Diaka J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology.* 1993;39:1279-1289.
- Linde Forsberg C, Forsberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Repro Fertl Suppl.* 1989;39:299-310.
- Linde-Forsberg C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin No Am : Am Anim Prac* 1991;21:467-485.
- Robertson JB, Srsen V, King W.A. Cytogenic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured in vitro. *Theriogenology.* 1996;46:1808-1810.
- Rota A, Stram B, Linde-Forsberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology.* 1995;44:885-900.
- Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology.* 1997;47:1093-1101.
- Strom B, Rota A, Linde-Forsberg C. In-vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology.* 1997; 48:247-256.